

金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的基因克隆、表达及活性试验

胥全彬* 刘传暄 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850)

摘要 利用 PCR 从金黄色葡萄球菌标准株 (*Staphylococcus aureus*, ATCC13565) 中克隆了金黄色葡萄球菌肠毒素 A (SEA) 的基因, 序列测定结果与报道完全一致。构建了表达载体 pET-SEA 并获得高效表达, 重组蛋白 (rSEA) 在 37°C 诱导时以包涵体形式存在, 降低温度则出现可溶表达, 可溶性 rSEA 占总 rSEA 的 55%。可溶性 rSEA 经 Ni²⁺ 亲和层析纯化, 达电泳纯。通过同源建模对 rSEA 对 SEA 进行结构比较, 结果表明尽管 rSEA 比野生型 SEA 多了 9 个氨基酸但其结构并没有明显的变化。单核细胞增殖试验进一步证明了该结论: 将 rSEA 与 SEA 同外周血单个核细胞共同培养, 两者均能有效地促进其增殖。将 rSEA 与体内激活的脾细胞共培养, 则能增强脾细胞的体外抑瘤活性。

关键词 重组金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因克隆 可溶表达 活性分析

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0402-05

超抗原是指一类逆转录病毒蛋白和细菌外毒素, 它们无需抗原递呈细胞的加工, 而能直接与抗原递呈细胞的 MHC 及 T 细胞的 TCR 结合, 并激活 T 细胞, 由于这类抗原以微量存在时, 即可激活大量的 T 细胞, 因而称之为超抗原 (Superantigen, SA_g)^[1-3]。早期研究发现, 超抗原能对 MHC-II⁺ 肿瘤细胞产生超抗原依赖的细胞毒作用 (SA_g-dependent cell-mediated T-cell-derived cytotoxicity, SDCC), 同时产生大量的细胞因子, 如 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 等, 从而产生系统的抗肿瘤反应, 因此超抗原概念一经提出, 其在治疗恶性肿瘤上的潜力便受到重视^[4-5]。金黄色葡萄球菌肠毒素 (*Staphylococcal enterotoxins*, SEs) 是由金黄色葡萄球菌分泌的一组具有超抗原活性的细菌毒素, 包括 SEA、SEB 以及毒性休克综合症毒素 1 (Toxic shock syndrome toxin, TSST-1) 等 11 种血清型^[6], 本实验克隆了金黄色葡萄球菌肠毒素 A 基因 *entA*, 实现了可溶性表达, 并对其生物活性进行初步研究, 为 SEA 的进一步应用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

E. coli BL21(DE3) 及 *E. coli* DH5 α 及原核表达载体 pET-22b(+) 由本室保存, *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565) 购自中国药品生物制品检定所; 小鼠

黑色素瘤细胞 B16 由本室保存。所用限制酶、T4 连接酶来自 TaKaRa 公司, 引物合成及序列测定由上海生工生物工程公司完成。PHA 及 SEA 标准品分别购自 Sigma 公司、北京邦定生物技术公司; Western blotting 化学发光检测试剂盒 (sc-2048) 购自 Santa Cruz 公司, 淋巴细胞分离液购自北京欣经科生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌 DNA 的提取: 接种金黄色葡萄球菌于 LB 液体培养基, 过夜培养, 离心收集菌体。总 DNA 的提取参照 Hopwood 等 (1985)^[7]。

1.2.2 SEA 基因 *entA* 的 PCR 扩增及表达载体构建: 取所提基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 各反应组分为: 2.5 μ L 10 \times pfu buffer、1 μ L 2.5mmol/L dNTP、25 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L、DNA 模板 2 μ L、17 μ L ddH₂O、0.5 μ L pfu。PCR 扩增程序: 95°C 变性 5min, 94°C 40s, 50°C 40s, 72°C 1min, 运行 30 个循环, 最后 72°C 延伸 5min, 4°C 保存。

PCR 扩增产物经酶切后, 连接到 pET-22b(+) 的 *Xho*I、*Nde*I 酶切位点之间, 构建重组质粒 pET-SEA。

限制酶酶切及连接转化均参照《Molecular cloning》(2nd)^[8]。

1.2.3 SEA 的表达: 接种转化了重组质粒 pET-SEA

的 BL-21 单菌落于液体 LB 中,在设定条件下诱导表达后,行 SDS-PAGE 电泳。rSEA 表达产物的存在形式、位置鉴定按 pET 产品手册进行。

1.2.4 rSEA 纯化 :pET-SEA 转化 BL-21(DE3),低温诱导制备 rSEA 的可溶表达上清,过滤后 4℃ 保存。装好 Chelating Sepharose 柱,按常规上 Ni²⁺、平衡层析柱,上样品,用平衡缓冲液平衡至基线后,用洗脱液(20mmol/L Tris-HCl 0.5mol/L NaCl 25 ~ 250mmol/L 咪唑, pH8.0)梯度洗脱,收集洗脱峰,将含目标蛋白的洗脱组分进行浓缩、除盐,并对纯度进行分析。

SDS-PAGE 中蛋白相对含量的确定在天能 GIS 凝胶图像处理系统中完成。蛋白银染程序参照《Molecular cloning》(2nd)^[8]融合蛋白的 Western 检测参照试剂盒说明进行。纯化蛋白浓度的测定按 BCA Protein Assay Kit(Pierce)说明进行。

1.2.5 SEA 刺激外周血单核细胞增殖试验 :取正常人外周血抗凝后,按常规方法行密度梯度离心分离外周血单个核细胞(PBMCs)。用 RPMI-1640 培养液调节细胞浓度,以 1 × 10⁶ cells / well 加到 96 孔板中,将 50ng SEA、rSEA 加到各孔中,BSA 为阴性对照,PHA 为阳性对照,每样复 3 孔。按常规条件培养 72h 后,加入 20μL MTT 液。继续培养 4h,1000r/min 离心收集细胞,加入 DMSO120μL,溶解 15min 后,在酶联仪上以 570nm 测定各孔的吸光值。

1.2.6 rSEA 激活 NK 细胞体外抑瘤试验 :参照 Dohlsten 等方法^[5]进行并稍加修改,具体如下:将 50μg SEA 腹腔注射小鼠,24h 后按常规处死 C57BL/6 小鼠,无菌取脾,制备单细胞悬液。以 7.5 × 10⁵ cells / well 浓度,加入到 96 孔板,每孔 100μL,将 B16 细胞以 2.5 × 10⁴ cells / well 加入到 96 孔板,将 rSEA 用 RPMI 1640 培养基稀释后,将不同量的 rSEA 加入各孔。同时设置空白对照(仅加 DMEM)、肿瘤对照(含与处理样品等数量的 B16 细胞)及 BSA 阴性对照。37℃ 过夜培养后,用培养基洗细胞 3 次,加入 20μL 5mg/mL 的 MTT 液。继续培养 4h,移去上清,加入 DMSO120μL,溶解 15min 后,在酶联仪上用空白对照调零,以 570nm 测定各孔的吸光值。抑瘤率的计算公式如下:

$$\text{抑瘤率(Tumor growth inhibition, \%)} = 100 - (T / C) \times 100$$

C: 肿瘤细胞对照组光吸收值; T: 处理组光吸收值

2 结果

2.1 SEA 的克隆及表达载体的构建

所提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA 经 0.8% 的

琼脂糖凝胶电泳后, DNA 条带主要存在于加样孔与 21.227kb 之间,说明所提取的 DNA 无明显降解。依据 Borst 等人^[9]报道的 SEA 基因序列,设计了以下引物:上游引物 P1, 5'-CCA CTT GTA CAT ATG AGC GAG AAA AGC-3';下游引物 P2, 5'-TGT TGA AAA CTA CCA CTC GAG ACT TGT-3'。横线所示为添加的酶切位点,扩增的基因片段为 SEA 的成熟肽编码区。为了表达产物的金属整合亲和层析,将 ent A 的终止密码子 TAA 突变为 GAG,使其在 pET-SEA 表达载体上表达时,融合了 6 个组氨酸的纯化标签。

SEA 基因是一个富含 AT 的基因,尤其是下游 3'端。为了使下游引物在扩增 SEA 基因 3'端 AT 富含区时避免出现错误引发,所设计下游引物 P2 中仅有 6 个与 SEA 成熟肽基因配对的碱基,其余碱基则来自于终止子序列,这样 PCR 扩增有较好的特异性和扩增效率。SEA 的 PCR 扩增及 SEA 克隆的酶切鉴定见图 1、2。测序结果表明:所克隆序列与报道的 SEA 成熟肽基因序列完全一致。

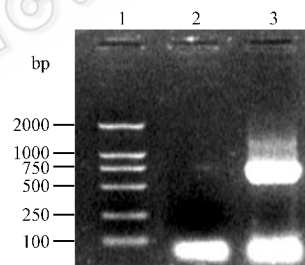


图 1 SEA 基因的扩增

Fig.1 Amplification of entA gene from *Staphylococcus aureus* genomes DNA

1. DL2000 markers; 2. Blank control; 3. PCR products of entA

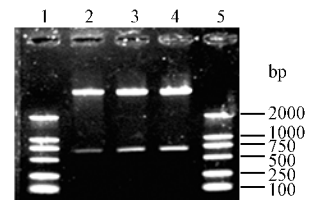


图 2 SEA 阳性克隆的酶切鉴定

Fig.2 Verification of positive clone with entA gene by double RE digestion

1&5. DL2000 marker; 2~4. Result of double RE digestion of positive clone

2.2 SEA 的可溶表达及纯化

将重组质粒 pET-SEA 转化 BL-21(DE3)宿主菌,获得工程菌 BL-21(DE3, pET-SEA)。过夜培养后,用 1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,诱导时间分别为 2、3、4h,结果表明 rSEA 产量在 4h 内随时间的延长而增加(图 3)。用终浓度在 0.5、1.0、1.5 mmol/L 的 IPTG

诱导培养 3h 后,结果表明 1.0mmol/L 的 IPTG 即可使 rSEA 获得高效表达,而更高浓度的 IPTG 并没有使 rSEA 的表达升高(图 4)。将 pET-SEA 在 37℃ 以 1 mmol/L IPTG 诱导 3h,结果在该条件下表达的 rSEA 几乎全部是包涵体(结果未附)。将诱导温度降低至 28℃ 培养过夜,SEA 出现了部分可溶性表达,可溶性 rSEA 占总 rSEA 的 55% 左右(图 5)。将低温诱导的可溶性蛋白通过金属螯合亲和层析进行纯化,纯化产物经 SDS-PAGE 分离,由于重组蛋白浓

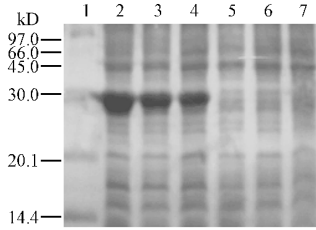


图 3 诱导时间对 rSEA 表达量的影响

Fig.3 Effect of inducing duration on Expression of rSEA

1. Protein markers 2~4. Inducing for 4, 3, 2h 5~7. BL-21(DE3) with positive plasmid without induction , with pET-22b(+) and no plasmid induction for 3h

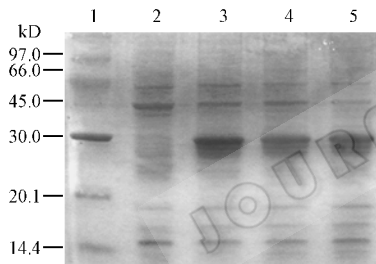


图 4 IPTG 浓度对 rSEA 表达的影响

Fig.4 Effect of IPTG concentration on expression of rSEA

1. Protein markers ;2. Positive plasmid without IPTG induction ; 3 ~ 5 : BL-21(DE3) with pET-SEA induced with 0.5 ,1.0 and 1.5 mmol/L IPTG

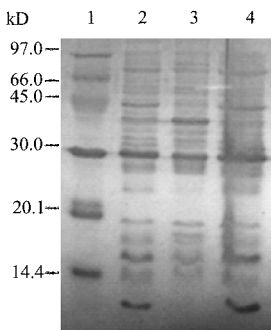


图 5 rSEA 的可溶表达

Fig.5 The soluble rSEA was obtained by inducing at low temperature

1. Protein marker 2. rSEA in supernatant of sonic bacterial 3. Inclusion body in BL-21(DE3), 4. Total protein in BL-21(DE3) with pET-SEA plasmid

度不高,通过考马斯亮蓝染色不易发现杂蛋白的存在(图 6A)。而微量的超抗原就能发挥很强的 T 细胞激活活性,超抗原的纯度对于其活性分析比较重要。因此,为进一步检测蛋白纯度,又利用灵敏度比考马斯亮蓝高 100~1000 倍的银染对蛋白纯度进行进一步检测,结果表明所纯化蛋白电泳纯(图 6B)。为了对 rSEA 的特异性表达作进一步鉴定,采用 6XHis 单抗对表达产物进行 Western 检测,结果在全菌表达产物中能检测到一条与纯化蛋白相同分子量的特异性蛋白条带(图 7)。

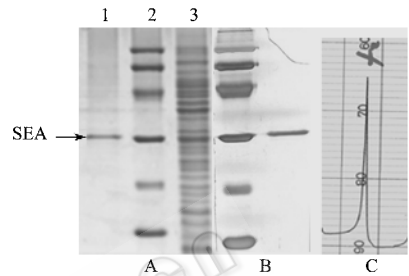


图 6 rSEA 的纯化

Fig.6 Purification of rSEA

A. 1. Purified rSEA 2. Protein Marker 3. Total bacterial products ;B . Purified rSEA stained by silver salt ; C. Dilution curve of rSEA purification

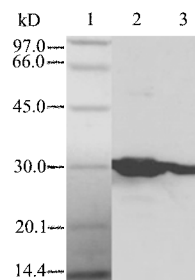


图 7 rSEA 表达的 Western 检测

Fig.7 rSEA expression by Western-blotting

1. Protein marker 2. Total proteins of bacterial protein 3. Purified rSEA

2.3 SEA 刺激外周血单核细胞增殖实验

以 PHA 为阳性参照,以 BSA 为阴性对照,对本实验纯化所得的 rSEA 的活性进行检测,结果表明 rSEA 能显著地刺激外周血单个核细胞增殖,SEA 与 rSEA 的活性差异不显著($P > 0.05$) (结果见图 8)。

2.4 rSEA 激活脾细胞体外抑瘤试验

将不同剂量 rSEA 与体内激活的脾细胞、小鼠 B16 黑色素瘤共培养,结果能产生剂量依赖的肿瘤生长抑制作用(结果见图 9)。

3 讨论

SEA 基因全长为 774bp,共编码 257 个氨基酸,

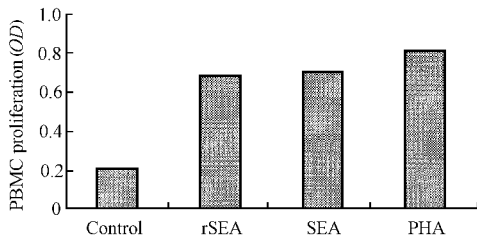


图 8 rSEA 的外周血单个核细胞增殖试验

Fig. 8 Proliferation of PBMC by rSEA

The PBMC was pretreated by BSA negative control, PHA positive control, rSEA and SEA protein

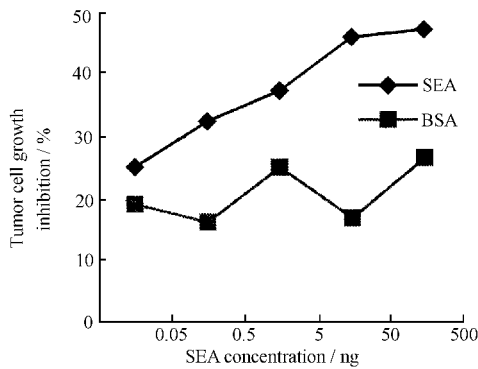


图 9 rSEA 激活脾细胞体外抑制 B16 细胞生长试验

Fig. 9 Anti-tumor activity of SEA by activating spleen cell

其中前 72bp 编码 24 个氨基酸的信号肽,成熟肽形成由 β 桶、 β 抓握结构 (β -grasp) 两个结构域组成的扁平分子^[10]。有文献表明 SEA 的 C 端和 N 端的氨基酸对于 SEA 的活性非常重要,缺失使其活性大幅降低^[11-12],而在其两端增加氨基酸对其活性有无影响尚无报道。通过软件 DNAssist1.0 (Written by Hugh Patterson) 对重组 SEA 的基本理化性质进行初步分析,结果表明重组 SEA 由 242 个氨基酸组成,分子量约为 28kD,等电点为 6.6,而野生 SEA 由 233 个氨基酸组成,分子量约为 27 kD,等电点为 6.7。进一步利用 Swiss-Model 自动建模程序^[13]对野生性 SEA 及 rSEA 的三维结构进行比较,结果表明 rSEA 尽管比野生型 SEA 增加了 9 个氨基酸,但总体的构象并未受到影响(图 10)。外周血单核细胞增殖试验进一步证明:重组后的 SEA 在分子量、等电点发生了一些改变,但其三维结构没有受到影响,仍能显著刺激 PBMC 的增殖,活性与野生型 SEA 相当。

高聚金葡素 (HAS) 是我国沈阳协和集团自行研制的第一个应用于临床的超抗原抗癌药物,它是从葡萄球菌代谢产物中提取的生物反应调节剂,其主要成分是 SEC。通过近 10 年来的临床研究表明将高聚金葡素单独或与其它化疗药物联合应用能对恶

性肿瘤的治疗中产生较好的效果。如高聚金葡素配

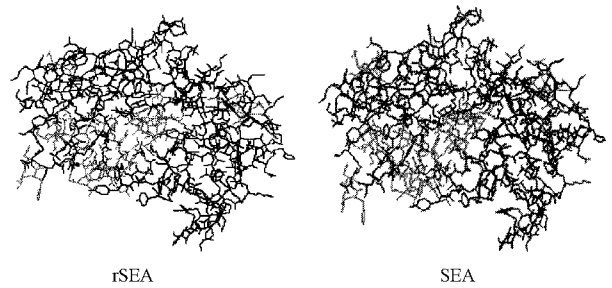


图 10 SEA 及 rSEA 的三维结构比较

Fig. 10 3- dimension structure Comparing of SEA and rSEA by modeling

合化疗能抑制化疗引起的肝癌细胞多药抗药性基因的表达,提高 NK 细胞活性,改善患者的生存质量^[14]。国外以 SEA 为基础的超抗原药物在动物模型中取得较好的效果,其中 PNU-21456 (SEA 单抗融合蛋白) 已经进入 I 期临床^[15]。本研究克隆表达了 SEA,为其抗癌应用研究,打下了基础。初步体外试验表明:健康小鼠的脾细胞在经 rSEA 刺激后,能对 B16 肿瘤细胞产生明显的杀伤作用。由于 B16 肿瘤细胞是 MHC- II 阴性,它不能扮演抗原递呈细胞的角色,即体内激活脾细胞产生的抑瘤效应主要是由 NK 细胞等非特异性免疫引起。在本研究中,健康 C57BL/6 小鼠的正常 NK 细胞在 SEA 体内激活后,其抑瘤活性升为 26.7%,rSEA 进一步体外刺激后抑瘤活性升至 47.2%,因此应用超抗原则有可能增强免疫系统非特异性抑瘤效应,扭转肿瘤发生对机体造成的免疫抑制。

致谢:本研究得到赵志虎、于秀琴、张艳红、任洌和郭艳梅等同志的帮助,在此致谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] White J, Herman A, Pullen A M *et al.* V Beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal detection in neonatal mice. *Cell*, 1989, **169**: 457 - 467
- [2] Dellabona P, Peccoud J, Kappler *et al.* Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell*, 1990, **62**: 1115 - 1121
- [3] Irwin M J, Hudson K R, Fraser J D *et al.* Enterotoxin residues determining T cell receptor V β binding specificity. *Nature*, 1992, **359**: 841 - 843
- [4] Dohlsten M, Lando P A, Hedlund G *et al.* Targeting of cytotoxic T lymphocytes to MHC-expressing cells by staphylococcal enterotoxins. *Immunology*, 1990, **71**: 96 - 100
- [5] Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M *et al.* Superantigen-induced cytotoxic suppress growth of human colorectal carcinoma cells. *Int. J. Canc*

- cer, 1993, **54**: 482 - 488
- [6] Lavoie P M, Thiodeau J, Francois E *et al* .Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunological reviews*, 1999, **168**: 257 - 269
- [7] Hopwood D A, Bibb M J, Charter K F *et al* . Genetic manipulation of streptomyces : a laboratory manual : England :the John Innes Foundation ,1985
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*(2nd), New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989
- [9] Borst D W, Betley M J. Mutations in the promoter spacer region and early transcribed region increase expression of staphylococcal enterotoxin A. *Infection and Immunity*, 1993, **61**: 5421 - 5425
- [10] Schad E M, Zaitseva I, Zaitsev V N *et al* . Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. *The EMBO Journal*, 1995, **14**: 3292 - 3301.
- [11] Theresa O H, Marsha J B. Biological activities of enterotoxin type A mutants with N-terminal substitutions. *Infection and Immunity*, 1995, **63**(6): 2133 - 2140
- [12] Wendy O H, Mary T T, Marsha J B. The carboxyl-terminal region of staphylococcal enterotoxin type A is required for a fully active molecule. *Infection and Immunity*, 1991, **59**(6): 2126 - 2134
- [13] [Http://www.expasy.org/swissmod/swiss-model.html](http://www.expasy.org/swissmod/swiss-model.html)
- [14] JIANG X I(江学良), QUAN Q Z(权启镇), XIE Z Q(谢宗贵) *et al* . Effect of highly agglutinative staphylococci on MDR gene expression and NK cell activity in patients with advanced hepatoma. *Chinese Journal of Tumor Clinic*(中国肿瘤临床), 1998, **25**(7): 546 - 547
- [15] Giantonio B J, Alpaugh R K, Schultz J *et al* . Superantigen-based immunotherapy : A phase I trial of PNU-214565, a monoclonal antibody-staphylococcal enterotoxin A recombinant fusion protein, in advanced pancreatic and colorectal cancer. *J Clinical Oncology*, 1997, **15**: 1994 - 2007

Gene Cloning , Soluble Expression and Activity Analysis of rSEA

XU Quan-Bin* LIU Chuan-Xuan MA Qing-Jun

(Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100850 , China)

Abstract The superantigen, such as staphylococcal enterotoxins, had been identified as possible anti-cancer molecules in many reports. In this paper, we cloned the entA gene encoding Staphylococcal enterotoxin A from the genomic DNA of *Staphylococcus aureus* (ATCC13565) by PCR, the sequence cloned was accordance with that reported in Genbank. The entA gene could be expressed effectively after inserted into plasmid pET-22b(+), The rSEA was expressed as inclusion bodies when induced by IPTG at 37 °C and became soluble after induced at low temperature, the soluble part is about 55% of total rSEA products. Only one band was detected by western-blotting in expression product of BL-21(DE3) with pET-SEA. The soluble rSEA was purified by Ni²⁺ chelating sepharose column. No other protein except rSEA was seen in SDS-PAGE gel stained by both Coomassie brilliant blue and silver salt, which showed that the rSEA was purified effectively. Homology modeling of rSEA determined the structure change was conducted, which indicated there was no apparent structure change between rSEA and native SEA. This result was also confirmed by proliferation assay of PBMC, for the rSEA could induced proliferation of PBMC as effectively as native SEA. The increasing anti-tumor activity of rSEA was also detected after the spleen cell activated in vivo by rSEA, which was accordance with others reports. This work paved the way for the further study of anti-cancer with rSEA.

Key words recombinant staphylococcal enterotoxin A, gene cloning and soluble expression, proliferation activity of PBMC, anti-tumor activity